临床研究

环氧合酶-2和碱性成纤维细胞生长因子在鼻咽癌组织中的表达及与放疗敏感性的相关性

赵建夫,徐 萌,陈文慧,赵凤芝,王奕鸣,庄承海
暨南大学附属第一医院肿瘤科,广东 广州 510632

摘要:目的 探讨环氧合酶-2(COX-2)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)在鼻咽癌组织中的表达及其与放疗敏感性的相关性。**方法** 应用免疫组化方法检测97例鼻咽癌患者活检组织放疗前COX-2和bFGF的表达,并分析二者与放疗敏感性的关系。**结果** 97例鼻咽癌组织COX-2和bFGF阳性表达率分别为71.1%(69/97)和64.9%(63/97);COX-2的阳性表达与鼻咽癌的T分期和N分期有显著的相关性(P<0.05),bFGF的阳性表达与鼻咽癌的N分期有显著的相关性(P<0.05)。COX-2在放疗敏感组和放疗不敏感组的阳性表达率分别为62.8%和92.6%,bFGF在放疗敏感组和放疗不敏感组的阳性表达率分别为57.1%和85.2%,在鼻咽癌组织中Spearman相关分析发现,COX-2的表达与bFGF的表达呈明显正相关(相关系数r=0.486,P<0.05);根据COX-2和bFGF表达情况,把患者分为4组:COX-2(-) and bFGF(-),COX-2(-) and bFGF(+),COX-2(+) and bFGF(-),and COX-2(+) and bFGF(+)。联合COX-2表达和bFGF表达分析后,发现不同亚组与鼻咽癌的放疗敏感性明显相关(P<0.05)。**结论** COX-2和bFGF在鼻咽癌组织中的表达升高,且两者与肿瘤的放疗敏感性明显相关,可作为预测鼻咽癌放疗敏感性的重要指标。

关键词:鼻咽癌;环氧合酶-2;碱性成纤维细胞生长因子;放疗敏感性

Expressions of cyclooxygenase-2 and basic fibroblast growth factor in nasopharyngeal carcinoma and their association with radiotherapy sensitivity

ZHAO Jianfu, XU Meng, CHEN Wenhui, ZHAO Fengzhi, WANG Yiming, ZHUANG Chenghai
Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: Objective To detect the expressions of cyclooxygenase-2 (COX-2) and basic fibroblast growth factor (bFGF) and evaluate their value in predicting the radiotherapy sensitivity in nasopharyngeal carcinoma (NPC). **Methods** The expressions of COX-2 and bFGF were detected immunohistochemically in biopsy samples of NPC, and their relationship with the radiotherapy sensitivity of the tumors were analyzed. **Results** In 97 NPC cases, the positivity rates of COX-2 and bFGF were 71.1% (69/97) and 64.9% (63/97), respectively. Correlation analysis demonstrated that a positive COX-2 expression was positively correlated with an advanced T status and N status, and bFGF expression was positively associated with an advanced N status in NPCs. In radiotherapy-sensitive and radiotherapy-insensitive cases, the positive rate of COX-2 was 62.8% and 92.6%, and that of bFGF was 57.1% and 85.2%, respectively. The expression of COX-2 was positively correlated with that of bFGF (r=0.486, P<0.05). The radiotherapy sensitivity differed significantly among patients with different statuses of COX-2 and bFGF positivity. **Conclusion** COX-2 and bFGF can be effective and sensitive biomarkers for predicting radiotherapy sensitivity in NPC.

Key words: nasopharyngeal carcinoma; COX-2; basic fibroblast growth factor; radiotherapy sensitivity

鼻咽癌是我国华南地区常见的恶性肿瘤之一,其恶性程度较高,早期即可出现淋巴结转移[1-2]。放射治疗是鼻咽癌(NPC)最主要的治疗手段,随着影像学水平和放疗技术的提高,鼻咽癌的局部区域控制率得到明显的提高[3-4]。目前存在的临床问题是放疗剂量缺乏个体化,NCCN指南[5]要求所有接受同期放化疗的II-VIb期鼻咽癌患者都给予鼻咽肿瘤68~70 Gy的放疗剂量。但是,不同类型肿瘤存在放射敏感性差异,且同一类型肿瘤的不同个体的放射敏感性也存在差异,因此,筛选出放射治疗敏感的鼻咽癌患者,对鼻咽癌的精准治疗尤为重要[6-7]。

环氧合酶-2(COX-2)是前列腺素(PGs)合成过程中的重要限速酶,在许多肿瘤组织中均呈高表达,通过促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、促进肿瘤血管形成等机制参与多种肿瘤的发生和发展,且与肿瘤的转移以及放疗抵抗有关[8-10]。本课题组前期研究发现碱性成纤维细胞生长因子单克隆抗体可以增强肿瘤的化疗敏感性,通过P-糖蛋白逆转乳腺癌耐药细胞株耐药性[11]。然而,COX

收稿日期:2016-06-17
基金项目:国家自然科学基金(81273814);广东省重大新药创制重大科技专项(2013A022100031)
Supported by National Natural Science Foundation of China (81273814).

作者简介:赵建夫,博士,E-mail: 594357558@qq.com

联合bFGF对鼻咽癌放射治疗敏感性的影响尚未见报道。本研究通过检测鼻咽癌患者放疗治疗前活检组织中COX-2和bFGF的表达情况，探讨两者对鼻咽癌放射治疗敏感性的影响，为将来开展鼻咽癌个体化放疗剂量的临床试验提供依据。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选择1995年1月~2010年12月在广州市暨南大学附属第一医院接受单纯放射治疗的鼻咽癌患者97例，治疗前均通过鼻咽组织活检病理证实为低分化鳞状细胞鼻咽癌。其中男性51例，女性46例；年龄25~72岁，中位年龄49岁。所有患者根据第7版美国癌症联合委员会/国际抗癌联盟（AJCC/UICC）的鼻咽癌TNM分期标准重新评定临床分期。本研究经本院伦理委员会批准，所有患者均签署知情同意书。

1.2 治疗方法

所有鼻咽癌患者均于我院住院完成全程常规放射治疗，采用6 mV-X线直线加速器1.8~2.0 Gy/次，1次/d，5次/周。常规放疗鼻咽部DT 70~74 Gy/35~37次，颈部淋巴结转移灶DT 70~76 Gy/35~37次。

1.3 近期疗效评定

放疗结束后3个月后复查鼻咽纤维镜、CT或MRI检查鼻咽部和颈部癌肿消退情况，根据按照按RECIST疗效评价标准评价，记录为完全缓解（CR）、部分缓解（PR）、病灶稳定（SD）或病灶进展（PD）。CR和PR的患者判定为放射治疗敏感组；SD和PD的患者放疗后3个月原发肿瘤或部分肿瘤持续存在或鼻咽腔出现新的病灶归为放疗不敏感组。

1.4 主要试剂

兔抗人COX-2单克隆抗体（编号：ab62331）和兔抗人bFGF多克隆抗体（编号：ab16828）均购自美国abcam公司，SP二步法试剂盒和DAB显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物公司。

1.5 免疫组织化学染色

全部石蜡组织切成4 μm厚切片，二甲苯脱蜡、梯度酒精水化、高压柠檬酸盐抗原修复后，采用链霉素-生物素过氧化物酶复合物（SP）免疫组化染色方法进行检测。具体方法按试剂盒说明书步骤操作，PBS作为一抗的阴性对照。

1.6 结果判定

COX-2和bFGF免疫组织化学染色均以细胞膜或胞浆中呈现棕黄色颗粒，且染色强度高于背景的非特异性染色判定为阳性。选择5个高倍视野（×400），计数100个细胞/视野，取其平均数，病理结果由两位病理科医生在不知道患者资料的情况下完成。阳性细胞占细胞总数的比例为=阳性细胞数/100×100%，阳性细胞>5%，定义为阳性；≤5%为阴性。

1.7 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件进行数据处理。两组率的比较采用χ^2检验，应用Spearman等级相关分析COX-2、bFGF表达的相关性，采用Kruskal-Wallis检验比较COX-2、bFGF联合后不同亚组与放疗敏感性的相关性。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 COX-2、bFGF在鼻咽癌组织中呈高表达

免疫组化结果显示，COX-2和bFGF在正常鼻咽粘膜上皮组织中表达呈阴性，50例鼻咽癌患者组织中，COX-2 和bFGF阳性表达率为71.1%（69/97）和64.9%（63/97），对同一患者组织标本两者均呈阳性表达率为56.7%（55/97）。COX-2染色主要为细胞膜阳性和浆阳性，分布于肿瘤细胞的细胞浆呈棕黄色颗粒或沿核膜周边呈线性状分布，bFGF染色主要是胞膜阳性，定位于肿瘤细胞浆（图1）。

2.2 COX-2、bFGF表达与鼻咽癌临床特征的关系

COX-2、bFGF在鼻咽癌组织中的表达与临床病理特征的关系见表1，结果显示，COX-2的阳性表达与鼻咽癌的T分期和N分期有显著的相关性（$P<0.05$），bFGF的阳性表达与鼻咽癌的N分期有显著的相关性（$P<0.05$）。在鼻咽癌组织中Spearman相关分析发现，COX-2的表达与bFGF的表达呈明显的正相关（相关系数$r=0.486$，$P<0.05$）。

2.3 COX-2、bFGF表达与鼻咽癌放疗疗效的关系

全程放疗治疗完成后随访3个月，CR和PR共35例患者，判定为鼻咽癌放疗敏感患组，SD和PD共27例判定为放疗不敏感组。COX-2、bFGF表达与鼻咽癌放疗疗效的关系见表2。COX-2在放疗敏感组和放疗不敏感组的阳性表达率分别为62.8%和92.6%，两组之间的疗效差异有统计学意义（$P<0.05$）；bFGF在放疗敏感组和放疗不敏感组的阳性表达率分别为57.1%和85.2%，两组之间的疗效差异有统计学意义（$P<0.05$）。相关性分析发现，COX-2和bFGF的阳性表达率具有明显的相关性，相关系数$r=0.486$。联合COX-2表达和bFGF表达分析后，发现不同亚组与鼻咽癌的放疗敏感性明显相关（$P<0.05$）。

3 讨论

鼻咽癌发病具有明显的地域性，以我国华南地区发病率最高，鼻咽癌又被称为“广东瘤”，好发于40岁~50岁的壮年时期[12]。放射治疗是鼻咽癌的最主要治疗手段，NCCN指南[5, 13]要求所有接受同期放化疗的II-VIb

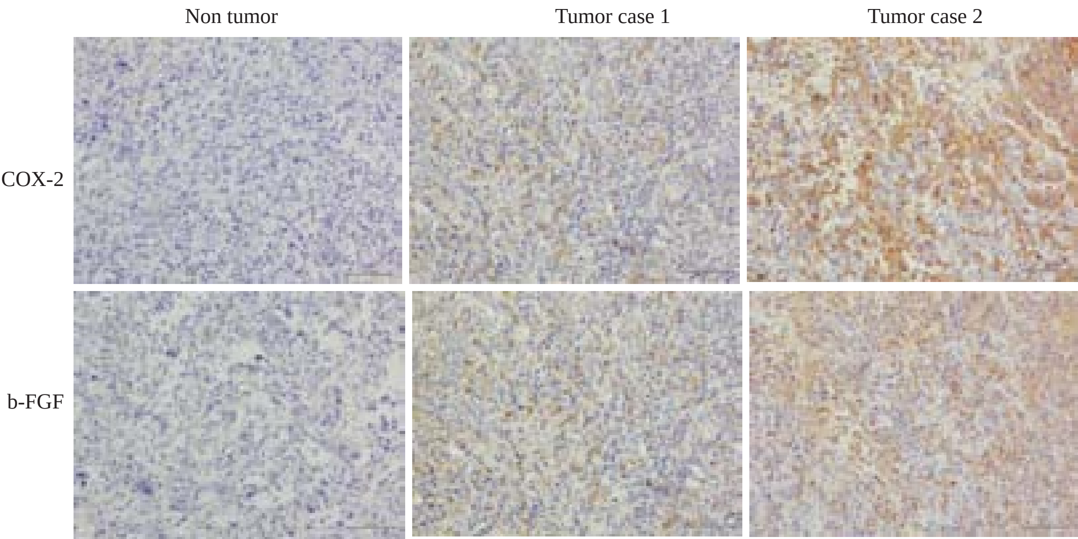


图1 免疫组织化学(IHC)检测COX-2和bFGF在鼻咽癌组织以及癌旁正常鼻咽粘膜上皮组织组织中的表达
Fig.1 Representative immunohistochemical images showing the expressions of COX-2 and bFGF in normal nasopharyngeal mucosa and NPC tissues (Original magnification: ×400).

表1 COX-2和bFGF表达与鼻咽癌临床特征的关系
Tab.1 Correlation of expressions of COX-2 and bFGF with clinicopathological features in NPC patients

Characteristics	*n*	COX-2 expression			bFGF expression		
		Positive expression	χ^2	*P*	Positive expression	χ^2	*P*
Age (year)			0.062	0.358		0.685	0.184
<49	49	35(71.4%)			34(69.4%)		
⩾49	48	34 (70.8%)			29 (59.2%)		
Sex			0.642	0.356		0.389	0.572
Male	51	36 (70.6%)			33(64.7%)		
Female	46	33 (72.7%)			30 (65.2%)		
T stage			2.321	0.010		4.367	0.068
T1	21	7(23.8%)			12 (57.1%)		
T2	45	34(75.6%)			30(66.7%)		
T3	21	18 (85.7%)			13(61.9%)		
T4	10	10 (100%)			8 (80.0%)		
N stage			3.226	0.032		2.579	<0.001
N0	17	8 (47.1%)			5 (29.4%)		
N1	29	18 (62.1%)			17 (58.6%)		
N2	37	30 (81.1%)			27 (73.0%)		
N3	14	13 (95.2%)			14(100.0%)		
M stage			0.986	0.076		2.360	0.186
M0	91	65 (71.4%)			59 (64.8%)		
M1	6	4(66.7%)			4 (66.7%)		
Clinical stage			3.360	0.128		2.127	0.156
I	17	9 (52.9%)			12(70.6%)		
II	26	21(67.4%)			15 (57.7%)		
III	39	27 (58.6%)			23 (60.0%)		
IV	15	12 (80.0%)			13 (86.7%)		

表2 COX-2和bFGF表达与鼻咽癌放疗疗效的关系

Tab.2 Correlation of expressions of COX-2 and bFGF with the radiation response of NPC

Group	Radiotherapy sensitive	Radiotherapy insensitive	*P*
COX-2 expression			0.008
+	44	25	
-	26	2	
bFGF expression			0.018
+	40	23	
-	30	4	
COX-2 and bFGF expression			0.014
COX-2 (-) and bFGF (-)	20	0	
COX-2 (-) and bFGF (+)	6	2	
COX-2 (+) and bFGF (-)	10	4	
COX-2 (+) and bFGF (+)	34	21	

期鼻咽癌患者都给予鼻咽肿瘤68~70 Gy的放疗剂量。目前存在的临床问题是放疗剂量缺乏个体化，临床上病理类型相同，临床分期相同的鼻咽癌患者给予相同的标准治疗方法和放射剂量，但其治疗疗效却大相径庭，主要原因是肿瘤组织本身对放射治疗的敏感性不同且放疗剂量单一[14-15]。有些鼻咽癌患者因各种原因局部和区域的病灶仅接受40 Gy的照射也获得长期的肿瘤控制[16-17]；有部分鼻咽癌病例，即使达到70~80 Gy的根治量，仍会残留和复发[18]。因此寻找筛选出放射敏感的鼻咽癌患者，对鼻咽癌精准放疗具有重要的作用。

COX是前列腺素(PGs)合成过程中的重要限速酶，包括COX-1和COX-2同工酶。COX-1在人体大多数正常组织中均表达；COX-2是一种诱导酶，在正常组织中不表达，细胞受到外界因素或内源性刺激时(细胞因子、内毒素、白介素、肿瘤促进剂等)能迅速诱导表达。COX-2在许多肿瘤组织中均呈高表达，通过促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、促进肿瘤血管形成等机制参与多种肿瘤的发生和发展，促进肿瘤的侵袭转移能力[8, 19]。COX-2在多种肿瘤组织中表达显著升高，且与肿瘤的转移以及放疗抵抗有关[8-10]。Inoue等[20]使用COX抑制剂双氯芬酸可减少放疗引起的COX-2和ki-67表达，通过抑制肿瘤细胞增殖，促进肿瘤细胞凋亡等机制，增强前列腺腺癌放疗敏感性。同时，沉默COX-2可改变鼻咽癌细胞的放射生物学参数，降低辐射诱导的G2/M期阻滞，增加抑瘤率，从而提高放疗敏感性[21]。本研究中COX-2在鼻咽癌中总的阳性表达率为68%，且与鼻咽癌的T分期、N分期密切相关。T分期代表原发肿瘤的大小及生长情况，证实COX-2在肿瘤的增殖过程中发挥重要作用。N分期代表区域淋巴结转移的存在与否及范围，提示COX-2可能与鼻咽癌的恶性进展相关。另外，COX-2的阳性表达率与、M分期和临床分期无明显相关性，考虑可能入组的病例数较少，需进一步扩大样本量减少偏倚。

bFGF是一个促细胞分裂、增殖及血管新生的多肽生长因子，在机体的胚胎发育与分化、血管生成、损伤组织修复等过程中起着重要调节作用。bFGF是主要的促血管生成因子之一，bFGF/FGFR信号可通过PI3K/AKT、PLCγ/PKC、Ras/Raf/MEK/ER等通路，发挥促进肿瘤增殖、血管新生和肿瘤耐药等功能。研究发现bFGF在多肿瘤组织中(乳腺癌、肺癌、黑色素瘤和肝癌等)高表达，通过新生血管等促进肿瘤发生、发展、浸润和转移[22-25]。本课题组前期研究发现bFGF单克隆抗体可以增强肿瘤的化疗敏感性，通过P-糖蛋白逆转乳腺癌耐药细胞株耐药性[11]。本研究结果显示，bFGF在鼻咽癌中阳性表达，且与鼻咽癌的N分期有显著的相关性。在鼻咽癌组织中Spearman相关分析发现，COX-2的表达与bFGF的表达呈明显的正相关。本研究首次证明COX-2和bFGF具有紧密的联系，发现鼻咽癌组织中COX-2的表达与bFGF的表达呈明显的正相关。

因此，对于COX-2和bFGF阳性表达的鼻咽癌患者，如果能预测此类患者对放射治疗不敏感，即可在治疗开始重新制定放疗计划，增加放疗剂量或者采用同步放化疗方案，或配合使用放疗增敏剂等，以预防远处转移，提高患者生存质量；对于COX-2和bFGF阴性表达的患者，预测其对放射治疗敏感，进一步评估后或可减少放疗剂量从而减少放疗的毒副作用，避免过度放疗，减少放疗后遗症，提高患者生存质量。

综上所述，鼻咽癌患者治疗前COX-2和bFGF的表达水平可能成为预测鼻咽癌放疗的敏感性指标，为鼻咽癌临床个体化治疗提供参考依据。

参考文献：

[1] Chang ET, Adami HO. The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma[J]. Oncology, 2006, 15(6): 1765-77.

[2] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[3] Tang LL, Li L, Mao YP, et al. Retropharyngeal lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma detected by magnetic resonance imaging-prognostic value and staging categories [J]. Cancer, 2008, 113(2): 347-54.

[4] Wei WI, Mok VW. The management of neck metastases in nasopharyngeal cancer[J]. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2007, 15(2): 99-102.

[5] Forastiere A, Goepfert H, Goffinet D, et al. NCCN practice guidelines for head and neck cancer. National Comprehensive Cancer Network [J]. Oncology (Williston Park), 1998, 12(7A):

39-147.

[6] Xu BQ, Tu ZW, Tao YL, et al. Forty-six cases of nasopharyngeal carcinoma treated with 50 Gy radiotherapy plus hematoporphyrin derivative: 20 years of follow-up and outcomes from the Sun Yat-sen University Cancer Center[J]. Chin J Cancer, 2016, 35(7): 37.

[7] Petersson F. Nasopharyngeal carcinoma: A review[J]. Semin Diagn Pathol, 2015, 32(1): 54-73.

[8] Li ZL, Ye SB, Ouyang LY, et al. COX-2 promotes metastasis in nasopharyngeal carcinoma by mediating interactions between cancer cells and myeloid-derived suppressor cells [J]. Oncoimmunology, 2015, 4(11): e1044712.

[9] Nix P, Lind M, Greenman J, et al. Expression of Cox-2 protein in radioresistant laryngeal cancer[J]. Ann Oncol, 2004, 15(5): 797-801.

[10] Terakado N, Shintani S, Yano JY, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with radioresistance in oral squamous cell carcinoma[J]. Oral Oncol, 2004, 40(4): 383-9.

[11] 陈文慧, 徐 萌, 杜超超, 等. 碱性成纤维细胞生长因子单克隆抗体通过P-糖蛋白逆转乳腺癌耐药细胞株MCF-7/ADM耐药性的分子机制[J]. 肿瘤, 2013, 33(9): 8-14.

[12] Wee JT, Ha TC, Loong SL, et al. The origin of genetic risk for nasopharyngeal carcinoma:a commentary on: is nasopharyngeal cancer really a "Cantonese cancer"[J]? Chin J Cancer, 2010, 29(5): 517-26.

[13] Zhang B, Tang PZ. Introduction to "NCCN clinical practice guidelines in head and neck cancer (2009 Chinese version)" [J]. Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi, 2009, 44(9): 707-9.

[14] Zheng YJ, Han F, Xiao WW, et al. Analysis of late toxicity in nasopharyngeal carcinoma patients treated with intensity modulated radiation therapy[J]. Radiat Oncol, 2015, 10(1): 17.

[15] Sun X, Su S, Chen C, et al. Long-term outcomes of intensity-modulated radiotherapy for 868 patients with nasopharyngeal carcinoma: an analysis of survival and treatment toxicities [J]. Radiother Oncol, 2014, 110(3): 398-403.

[16] 夏云飞, 张惠忠. 鼻咽癌不全放疗生存六年一例[J]. 癌症, 1986, 14(2): 78.

[17] Denys D, Kumar P, Wong FS, et al. The predictive value of tumor regression rates during chemoradiation therapy in patients with advanced head and neck squamous cell carcinoma [J]. Am J Surg, 1997, 174(5): 561-4.

[18] 严洁华, 胡郁华, 秦德兴, 等. 对局部顽固性鼻咽癌处理的研究. (一)加量照射是否需要-182例回顾性分析[J]. 中国放射肿瘤学, 1988, 2(3): 1-4.

[19] Samaka RM, Abdou AG, Abd El-Wahed MM, et al. Cyclooxygenase-2 expression in chronic gastritis and gastric carcinoma, correlation with prognostic parameters [J]. J Egypt Natl Canc Inst, 2006, 18(4): 363-74.

[20] Inoue T, Anai S, Onishi S, et al. Inhibition of COX-2 expression by topical diclofenac enhanced radiation sensitivity via enhancement of TRAIL in human prostate adenocarcinoma xenograft model [J]. BMC Urol, 2013, 13(8): 1.

[21] 孙权权, 刘 雄, 刘 英, 等. shRNAmir慢病毒载体沉默环氧合酶-2对鼻咽癌细胞放疗敏感性的影响[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(4): 599-603.

[22] Hsiung R, Zhu WZ, Klein G, et al. High basic fibroblast growth factor levels in nipple aspirate fluid are correlated with breast cancer [J]. Cancer J. 2002, 8(4): 303-10.

[23] Nissen LJ, Cao RH, Hedlund EM, et al. Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis[J]. J Clin Invest, 2007, 117(10): 2766-77.

[24] Akl MR, Nagpal P, Ayoub NM, et al. Molecular and clinical significance of fibroblast growth factor 2 (FGF2 /bFGF) in malignancies of solid and hematological cancers for personalized therapies[J]. Oncotarget, 2016, 7(28): 44735-62.

[25] 赵建夫, 徐 萌, 赵凤芝, 等. bFGF在恶性肿瘤中的表达及其临床病理意义[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(8): 590-6.

（编辑:孙昌朋）